

München 1959

Untersuchungen über die
antigene und allergene Wirkung eines aus
Brucella abortus hergestellten
Polysaccharids

Ilse Behr

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. A. Meyn

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
ANTIGENE UND ALLERGENE WIRKUNG EINES AUS
BRUCELLA ABORTUS HERGESTELLTEN POLYSACCHARIDS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ilse Behr

aus

Fürstenfeldbruck

München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Zipf

Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 28. 7. 1959

Meinen lieben Eltern



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literatur	3
A. Gebräuchliche Methoden zur Diagnostik der Brucellose	3
1. Direkter Erregernachweis	4
2. Antikörper-Nachweis	6
B. Die Entwicklung allergischer Proben zur Diagnostik der Brucellose	9
III. Eigene Untersuchungen	15
A. Material und Methodik	15
1. Herstellung der Polysaccharidfraktion	15
2. Tiermaterial	17
B. Versuchsergebnisse	17
1. Sensibilisierungsversuch an Meerschweinchen	17
2. Versuch, das Polysaccharid durch Adsorption an $Al(OH)_3$ zu einem Vollantigen zu machen	19
3. Intrakutanproben mit dem Brucellen-Poly- saccharid an banginfizierten Meerschweinchen	21
a) Bestimmung der Gebrauchsdosis	21
b) Untersuchung des Polysaccharids auf seine Eignung für den Kutantest bei infizierten Meerschweinchen	23
4. Intrakutanproben mit dem Brucellen-Poly- saccharid an Rindern	25
IV. Diskussion	27

	Seite
V. Zusammenfassung	31
VI. Literaturverzeichnis	33
Lebenslauf	

I. Einleitung

In den meisten bangverseuchten Ländern nimmt die Blutserumlangsamagglutination zur Diagnose der Brucellose bei Rind, Schwein und Schaf eine zentrale Stellung ein. Da diese serologische Probe jedoch auch manche Nachteile und Mängel aufweist (Titerbeurteilung, Fehlergebnisse bei trächtigen infizierten Rindern, organisatorische Schwierigkeiten), wäre es von großer Bedeutung, einen sicheren allergischen Hauttest, ähnlich der Tuberkulinprobe, auszuarbeiten.

In jüngster Zeit haben mehrere Autoren über solche Versuche, bei denen Polysaccharidextrakte von Brucellen verwendet wurden, berichtet. So ist es Mosimann (27) gelungen, ein Allergen herzustellen, das auch in der menschlichen Brucellosediagnostik verwendet wird. Weitere Polysaccharid-Allergene stellen das PEBA-Allergen von Ottosen und Plum, der Polysaccharid-Polypeptidkomplex PP von Jendrusch und die polysaccharidartige Substanz von Diernhofer dar. Mit diesen Fraktionen durchgeführte Versuche an Meerschweinchen, Kaninchen und Rindern haben aber bisher gezeigt, daß die Hautteste in der Brucellosediagnostik die herkömmlichen serologischen Verfahren noch nicht zu ersetzen vermögen.

Im Tierhygienischen Institut der Universität München ist von Wolf (42) ebenfalls ein Brucella-Polysaccharid hergestellt worden. Es war meine Aufgabe, diese Fraktion auf ihre antigenen und allergenen Eigenschaften an gesunden sowie infizierten, kleinen und großen Versuchstieren zu untersuchen.

II. L i t e r a t u r

A. Gebräuchliche Methoden zur Diagnostik der Brucellose

Die Brucellose der Schafe, Ziegen und Schweine, besonders aber die Rinderbrucellose ist in vielen Gebieten mit intensivem Wirtschaftsbetrieb stark verbreitet. Sie wird nicht nur in Mittel-, Süd- und Westeuropa häufig festgestellt, sondern kommt auch in den nordischen Ländern, in Nordamerika und Australien vor.

Besonders in Gebieten, in denen vorwiegend Milchwirtschaft betrieben wird, verursacht diese Krankheit schwere Verluste. Sie bestehen in jährlichen Kälberverlusten durch frühzeitiges Verwerfen und in einer erheblichen Verminderung der Milchleistung infizierter Rinder. Außerdem nehmen viele Kühe nach dem Verwerfen schwer oder überhaupt nicht mehr auf und müssen deshalb wegen Unwirtschaftlichkeit abgestoßen werden. Neben diesen für die Landwirtschaft entstehenden großen Schäden kommt auch der Ansteckungsgefahr für den Menschen eine erhebliche Bedeutung zu. Der Infektion per contaginem sind alle beruflich mit Tieren umgehenden Personen, besonders Tierärzte und Stallpersonal ausgesetzt. Eine weitere Infektionsmöglichkeit besteht in der Aufnahme von brucellenhaltiger Milch oder ihrer Produkte. Mingle (26) erklärt im Hinblick auf die Ausbreitung der Brucellose in Amerika: "Es gibt wahrscheinlich in den Vereinigten Staaten z. Zt. keine Tierkrankheit, die eine größere Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellt als die Brucellose." Habs (11) bezeichnete die Brucellose als die Anthropozoonose der Zukunft.

Die Gefährlichkeit der Abortus-Bang-Seuche macht intensivste Bekämpfungsmaßnahmen erforderlich. Wie bei der Bekämpfung jeder Seuche gilt dabei auch hier der Satz von Götze (10), daß "die Diagnose Grundlage allen Handelns ist".

Die Diagnose der Brucellose kann durch den direkten Erregernachweis oder auf indirektem Wege durch den Nachweis von Antikörpern in Blut und Milch gestellt werden.

1. Direkter Erregernachweis:

Der mikroskopische, kulturelle oder tierexperimentelle Nachweis der Erreger ist die sicherste Methode zur Diagnostik der Brucellose.

- a) Zum mikroskopischen Nachweis werden die von Placentateilen, vom Uterusausfluß, von der Milch oder von Teilen der ausgeworfenen Frucht angefertigten Ausstriche nach besonderem Verfahren gefärbt und der mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Morphologisch stellen die Brucellen kleine, gramnegative, unbewegliche und unbesporete Stäbchen dar. Hinsichtlich ihrer Färbbarkeit ist die Alkalifestigkeit von Bedeutung, auf die sich die heute üblichen Färbmethoden aufbauen.
- b) Für die kulturelle Züchtung bezeichnete Huddleson (16) einen Tryptoseagar mit 2 % Tryptose, 0,1 % Glukose, 0,5 % NaCl und 0,06 % Argininhydrochlorid, bei einem pH von 7,3 als bestes Nährmedium. Stockmayer (40) benützte zur Züchtung von Brucellakeimen aus der Milch einen aus Leberagar mit Zusatz von Gentianaviolett hergestellten Elektivnährboden, der den Vorteil hatte, eine hemmende Wirkung auf die gewöhnliche Milchflora auszuüben. Nach Köser und Plate (21) ist das Kulturverfahren jedoch nur wenig befriedigend und liefert nur in 22,4 % positive Ergebnisse.

Für die Kultur der Bang-Erreger aus dem Blute empfiehlt Lippelt (23) die unmittelbare Übertragung von Krankenblut in Traubenzucker-, Pepton- oder Leberbouillon. Nach vier Tagen gelingt es dann im allgemeinen, die Bakterien durch Aussaat auf Agarplatten nachzuweisen. Positive Kulturergebnisse erhielt er auf diese Weise auch bei der Untersuchung von Gelenkpunktaten, Plazenten, Milch und Kolostrum.

Als bestes Medium zur Reinzüchtung von Brucellen aus verunreinigtem Material gilt heute das von Kusdas und Burgisser hergestellte "Milieu W" (Albumin-agar + Antibiotika). Baumgartner (1) und Börger (3) gelang es, damit bei einer Reihe von Versuchstieren die Brucellenausscheider sicher festzustellen. Dieser Nährboden wird auch im Tierhygienischen Institut zur Brucellenisolierung verwendet.

- c) Der Nachweis von Brucellen im Tierversuch gilt als zuverlässigste Methode (Börger, 3). Als Versuchstier eignet sich besonders das Meerschweinchen, bei dem neben dem Bluttitern und den pathologisch-anato-

mischen Veränderungen, die nach 7 - 8 Wochen auftreten, eine Infektion auch bereits 2 - 3 Wochen post infectionem durch den Bakteriennachweis in Milz und Lymphknoten erkannt werden kann. Diese Lymphknotenmethode bezeichnen Köser und Plate (21) als besonders vorteilhaft, da dadurch ein frühzeitiger, direkter Brucellennachweis möglich ist. Smitmans und Eschbaum (33) führten Versuche an Meerschweinchen mit bang-verdächtigen Milchproben durch und beobachteten, daß nicht jedes Tier auf die Injektion keimhaltiger Milch ansprach. Sie empfehlen deshalb, verdächtige Milchproben jeweils an zwei Meerschweinchen zu verimpfen. Aber nicht nur zum Nachweis der Erreger in der Milch, in Gelenkpunktaten und in Plazenten kommt dem Tierversuch eine große Bedeutung zu, sondern auch bei der Diagnostik banginfizierter Bullen. Weiß (41) verimpfte Sperma und Präputialflüssigkeit an einige Meerschweinchen und erklärte diese Methode als äußerst zuverlässige und sichere Ergänzung der serologischen Untersuchung. Auf Grund all dieser guten Ergebnisse gilt heute in der Tiermedizin der Meerschweinchenversuch als geeignete Methode zum direkten Nachweis der Erreger. Versuche von Metzger, Beaudette und Stokes (24) sowie von Spink und Mitarbeitern (34), Hühnerembryonen zum Nachweis von Brucellen zu benützen, brachten keine befriedigenden Ergebnisse.

2. Antikörper-Nachweis:

a) Im Blutserum

Das Prinzip der Serodiagnostik besteht darin, in den Körpersäften Stoffe nachzuweisen, die nach stattgehabter Infektion oder auch nach künstlicher Immunisierung im Blute auftreten. Dabei spielen besonders Agglutinine eine Rolle. Das sind Eiweißkörper, die spezifisch wirken, d. h. sie bringen nur die entsprechende Bakterienart zur Verklumpung (Agglutination). Agglutinine wurden erstmals von Gruber (1896) als besondere Antikörper im Blut erkannt und von Widal zur Typhus- und Paratyphusdiagnose ausgenutzt. Geringe Mengen von Agglutininen gegen manche Bakterienarten sind schon im Normalserum enthalten und werden als Normalagglutinine bezeichnet. Kommt es über den Normaltiter hinaus zu einer Agglutination, so bedeutet dies, daß diese Agglutinine durch Einwirkung spezifischer Krankheitserreger gebildet wurden (Rolle, 30). Bei der Brucellose gilt heute als anerkannt sicherste Methode zur Feststellung der Antikörper die Blutserumlangsamagglutination (SLA). Bei auftretenden Zweifelsfällen können auch andere Reaktionen, wie z. B. die Meinicke- und die Sachwehrektion herangezogen werden. Auch die Komplementbindungsreaktion hat sich hierzu gut bewährt. Als grobe Orientierungsprobe kann man mit Blutserum auch die Objektträger-Schnellagglutination durchführen.

Wie allen biologischen Reaktionen haften auch diesen serologischen Untersuchungsmethoden Fehlerquellen an, die zu diagnostischen Irrtümern führen können. So erklärt Diernhofer (6) zwar die SLA als die feinste und rechnerisch am besten auswertbare Probe, weist aber gleichzeitig auf die große Schwierigkeit hin, die Grenze zwischen positivem und negativem Titerbereich zu erkennen. Der Grund liegt darin, daß man bei diagnostischen Untersuchungen den Normaltiter der Tiere nicht kennt. Man ist daher häufig im Zweifel, ob es sich um einen hohen Negativtiter oder um eine spezifische Erhöhung des ursprünglich sehr niedrig gewesenen Normaltiters, die positiv zu bewerten ist, handelt.

Auch Herter (12) spricht einem einmaligen Agglutinationsergebnis keine absolute Beweiskraft zu. Er führt folgende Möglichkeiten der Ergebnisauswertung an:

Bei negativem Ausfall der Agglutination kann

1. das betreffende Tier brucellosefrei sein,
2. das Tier kann infiziert gewesen sein. Der Titer ist aber wieder zur Norm abgefallen.
3. Das Tier kann brucellose-infiziert sein, die Agglutinine sind aber nicht nachzuweisen (z. B. in der Inkubationszeit, während der Trächtigkeit, zur Zeit des Aborts).
4. Es handelt sich um ein frisches Serum mit Hemmungskörpern, den sog. inkompletten oder blockierenden Antikörpern, die eine Agglutination verhindern.

Bei positivem Ausfall der Reaktion kann das Tier entweder infiziert oder immunisiert sein.

Bei zweifelhaftem Titer kann es sich entweder um eine im Anstieg oder im Abklingen befindliche Infektion, um einen Impftiter oder eine sog. "unspezifische" Agglutination handeln.

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich, daß das Agglutinationsergebnis einen zum Zeitpunkt der Untersuchung bestehenden Zustand wiedergibt, der zwar festgestellt, aber nicht ohne weiteres, vor allem nicht ohne Vorbericht, gedeutet werden kann. Um das sog. Hemmungsphänomen weitgehend auszuschalten, empfiehlt neben Herter (12) auch Ehrsam (9), das Blut vor der Untersuchung mindestens 24 Stunden im Kühlschrank aufzubewahren. Bei hochtragenden, tatsächlich infizierten Tieren wurde häufig eine blutnegative Reaktion beobachtet und beschrieben (Schimmelpfennig (36), Hutyra - Marek (17)). Deshalb empfahlen diese Autoren eine ein- bis zweimalige Nachuntersuchung im Abstand von jeweils drei Wochen, um eine Infektion mit Sicherheit ausschließen zu können. Im allgemeinen kann man die gesamten Fehlerquellen, die der SLA anhaften, nach Wynnycykj (43) in zwei Gruppen einteilen, nämlich in die biologisch und die technisch bedingten. Zu den ersteren zählen die Verschiedenheiten und Veränderungen in der biochemischen und physiologischen Struktur der Reaktionskörper. Sie können Antigen, Serum usw. betreffen. Technische Fehlermöglichkeiten, die sehr häufig in Betracht kommen, sind in der Gewinnung, Zubereitung und Anwendung der Reagenzien und Glaswaren zu sehen. Außerdem spielen Ablesungsfehler bei der Beurteilung von Reaktionen durch verschiedene Personen eine Rolle. Trotz dieser zahlreichen Fehlerquellen,

die sich kaum ganz beseitigen lassen, kommt der SLA in der Brucellose-diagnostik die größte Bedeutung zu. Die Blutserum-Schnellagglutination (SSA), die sowohl mit Serum als auch mit Frischblut (Diernhofer) auf dem Objektträger durchgeführt werden kann, ist demgegenüber unzuverlässiger. Sie zeigt in der Regel mehr positive Reaktionen an, nach Schumann (39) etwa 20 % mehr als die SLA und alle anderen serologischen Proben, fällt also auch bei völlig gesunden Tieren positiv aus. Bei negativem Ausfall der SSA kann das Tier jedoch als gesund betrachtet werden. Deshalb kann man diese Probe zur schnellen Aussonderung völlig gesunder Tiere verwenden.

b) In der Milch

Zur serologischen Milchuntersuchung findet neben der Milchserumlangsam- und Schnellagglutination (MSLA und MSSA) und der Komplementbindungsreaktion seit 1937 vor allem die von Fleischhauer entwickelte Abortus-Bang-Ringprobe Verwendung. Es ist dies eine einfach und schnell durchzuführende Methode, die trotzdem in ihrer Sicherheit der MSLA gleichkommt. Schaaf (zit.nach 35) fand an Hand von Massenuntersuchungen, daß die ABR sogar mehr positive Milchproben anzeigte als die MSLA. Nachteilig wirkt sich aus, daß die Probe nur bei in Laktation stehenden Tieren durchgeführt werden kann. Trockenstehende Kühe, Jungtiere und Bullen können mit dieser Probe nicht erfaßt werden. Dennoch ist der Wert und die Brauchbarkeit dieser Probe zur Überwachung brucellosefreier Bestände und für die übergeordnete, orientierende Bangermittlung unbestritten (Schimmelpfennig 36).

B. Die Entwicklung allergischer Proben zur Diagnostik der Brucellose

Schon jahrzehntelang gehen die Bemühungen dahin, allergische Proben als Diagnostikum bei der Bekämpfung der Brucellose mitzuverwenden. Die ersten Schritte in dieser Richtung unternahmen McFadyean und Stockmann (zit. nach 27) im Jahre 1909 mit einer Subkutanprobe. Sie injizierten Filtrate von Bangbakterienkulturen subcutan an Rinder und konnten bei infizierten Tieren Temperatursteigerungen beobachten. Ähnliche Versuche von Brüll, Belfanti, Caspar, Zeller und Zwick, Mohler und Traum (alle zit. nach 17) fielen im Vergleich zu den serologischen Blutuntersuchungen jedoch sehr unterschiedlich aus. Auch Meyer und Harndenbergh (zit. nach 4), die 1914 die subcutane Probe mit einem durch Alkoholfällung erhaltenen gereinigten Extrakt durchführten, konnten eine Übereinstimmung mit den serologischen Untersuchungen nur in 59,3 % der Fälle beobachten.

Bessere Ergebnisse erhielt van der Hoeden (zit. nach 4) 1932 mit der Bindehautprobe. Er benützte eine Brucellenagarkulturaufschwemmung, die 36 Stunden lang bei 56° C abgetötet und mit der gleichen Menge Glycerin versetzt worden war. Als positiven Reaktionsausfall deutete er den 8 - 12 - 20 Stunden nach der Einträufelung auftretenden eitrigen Augenausfluß. Nach Loktyeva (zit. nach 17) soll diese Augenprobe erst dann zuverlässig sein, wenn sie in 5 - 6tägigen Abständen 2 - 3mal wiederholt wird. Er begründet dies mit Beobachtungen, wonach tatsächlich infizierte Rinder bei der ersten Ausführung der Probe nicht reagierten.

Eine andere allergische Augenprobe, die Intrapalpebral-Probe, hat sich zur Diagnose der Schafbrucellose als geeignet erwiesen. Zeffass, Fritsche, Taylor und Schoregge (44) berichteten 1954 über ausgedehnte Untersuchungen anlässlich der Bekämpfung der Brucellose unter den Schafherden von Rheinland-Pfalz. Ihrer Ansicht nach ergibt die Serodiagnostik bei der Melitensinfektion der Schafe nur im Stadium der humoralen Immunität, also im ersten Stadium, zuverlässige Ergebnisse. Im weiteren Verlauf des Krankheitsgeschehens sinkt und schwindet allmählich die humorale Immunität, während die Zell- bzw. Gewebsimmunität, also die Allergie zur Ausbildung kommt, die dann im dritten Stadium ausschließlich die Immunitätslage bestimmt. Diese letzte Krankheitsphase läßt sich daher nur mit Hilfe eines spezifischen Allergens diagnostizieren. In ihren Versuchen erprobten sie ein von den ASID-Werken hergestelltes Brucellin. Sie injizierten 0,1 ccm dieses Allergens intrapalpebral,

wonach bei positiver Reaktion eine kaum schmerzhaft, wenig deutliche Schwellung am unteren Augenlid auftrat. Sehr gute Erfolge ließen sich dagegen mit dem von Roots aus dem Melitensisstamm "Jettenbach" hergestellten Allergen erzielen. 0,1 ccm dieses Allergens führte bei positiver Reaktion in wenigen Tagen zu halbkugeliger Anschwellung des unteren Augenlids, zu lokaler Rötung und Schmerzempfindlichkeit. Mitunter wurden sogar geringe Allgemeinstörungen beobachtet. Somit kann dieser Probe zur Diagnostik der Schafbrucellose große Bedeutung zugesprochen werden (Zerfass, Fritsche 44). Nachteilig wirkt sich aber aus, daß nach ihrer Anwendung Bang-Agglutinine im Blutserum auftreten. Aus diesem Grunde kann die Intrapalpebral-Probe auch beim Rind nicht angewendet werden. Über die Anwendung von Intrakutanproben bei Menschen berichtet Huddleson (15) im Jahre 1943 zusammenfassend. Danach applizierten Fleischner und Meyer 1918 hitzeabgetötete, in physiologische NaCl-Lösung suspendierte Brucella-Abortus-Keime an experimentell infizierte Meerschweinchen und erhielten eindeutige Reaktionen. Burnet verwendete im Jahre 1920 Kulturfiltrate von Brucella melitensis, Giordano 1929 hitzeabgetötete, suspendierte Bangbakterien und Lewien Suspensionen von mit Fettsolventien vorbehandelten Brucellen.

Rainsford, Foshay, Morales-Otero und Gonzalez (zit nach 4) stellten weitere Versuche an und erhielten mit den verschiedenen Allergenen zum Teil günstige Ergebnisse. Oft führte jedoch der Hauttest zu unangenehmen Reaktionen, vor allem zu Nekrosen, Schorfbildung und schlecht heilenden Hautdefekten. Dies bewog Huddleson (15), eine aus Brucellen hergestellte Nukleoproteinfraktion, die er "Brucellergen" nannte, für den Kutantest zu verwenden. Die Injektion von 0,1 ccm führte bei positiven Individuen zur Ausbildung eines lokalen Ödems und Erythems. Nur in einzelnen Fällen wurde Nekrose beobachtet. Von Jordan (20) und McCullough (25) wird dieses Brucellergen günstig beurteilt, da es ihrer Meinung nach weniger toxisch, besser standardisierbar und spezifischer als die meisten anderen Präparate ist. Nach Jordan (20) sollen damit sogar bedeutend mehr Personen positiv reagieren als bei der Agglutination.

Neben diesen Versuchen zur Anwendung des Kutantests in der Humanmedizin liegen auch Veröffentlichungen über Versuche mit der Intrakutanprobe bei Rindern vor. Schulz (38) führte als erster 1912 Versuche mit Abortusbouillonkulturen, die 1/4 Stunde erhitzt und im Wasserbad auf 1/10 ihres Volumens eingedampft worden waren, durch, konnte aber keinerlei Übereinstimmung mit den serologischen Blutbefunden feststellen.

Dietl (7) 1924 und Holtum (14) 1928 berichteten jedoch von bis zu 100%iger Übereinstimmung. Dietl ist sogar der Ansicht, daß sich mit seinem Intrakutantest (er verwandte Agarkulturabschwemmungen, die mit 2,5 % Glycerin versetzt und auf 1/10 ihres Volumens eingedampft worden waren) mehr infizierte Rinder erfassen lassen als mit der Blutuntersuchung. Sauter (32) überprüfte diese Versuchsergebnisse, erhielt aber einen so hohen Prozentsatz von Fehlergebnissen, daß er die Kutanprobe zur Diagnose der Rinderbrucellose als nicht verwendbar bezeichnete. In der Folgezeit befaßten sich zahlreiche Autoren mit diesem Problem, unter ihnen Edington und Broermann, Finzi, Rossi und Vigol, Mirri und Bisanti, Tropa, Serra, Raddatz (alle zit. nach 2 und 4). Alle Versuche mit den verschiedensten Allergenen hatten jedoch gemeinsam, daß im Vergleich zu den serologischen Blutuntersuchungen die Hautproben nur unbefriedigende Ergebnisse lieferten. Bemerkenswert ist, daß bis dahin nur von wenigen Autoren der chemische Aufbau dieses Allergens studiert worden war, und somit auch nicht erkannt wurde, inwieweit der Bluttitel durch diese Kutanteste zu beeinflussen war. Erst in neuerer Zeit studierten Huston, Huddleson und Hershey (zit. nach 2) den Aufbau aller drei Brucellenarten und extrahierten dabei neben den fettlöslichen Substanzen ein Nukleoprotein und zwei Polysaccharidfraktionen. Mosimann (27) stellte 1949 aus Bangbakterien vier Präparate her: einen Vollextrakt, eine Nukleoproteinfraktion, einen Gluko-Lipoid-Aminosäurekomplex (das Endotoxin) und ein Polysaccharid. Im Gegensatz zu den übrigen Fraktionen erwies sich das Polysaccharid im Mäuse- und Kaninchenversuch als atoxisch und nicht antigen. Daraus folgerte er, daß die Polysaccharidfraktion die Eigenschaften eines Haptens besitze und für den Kutantest optimal geeignet ist. Ein Hapten ist nach Landsteiner (zit. nach 42) ein Körper, der mit dem homologen Antikörper zwar in vitro reagiert, diesen Antikörper jedoch nicht selbst zu erzeugen vermag.

Mit dem von Mosimann hergestellten, nicht antigenen Polysaccharid führten Fust, Löffler, Mosimann und Schoch (zit. nach 2) Versuche an bangpositiven Personen durch und konnten deutlich Reaktionen in Form von Erythemen und Ödemen beobachten. Bürki, Mosimann und Margadant (5) berichten 1957 über ähnliche Versuche an Meerschweinchen, Kaninchen und Rindern. Sie prüften die antigene Wirkung des Polysaccharids mittels Agglutination, Präcipitation und Komplementbindungsreaktion und beobachteten das zeitliche Auftreten des positiven Kutantests bei künstlich infizierten Tieren. Sie verwendeten dabei vier verschiedene Konzentrationen des Polysaccharids, um die Stärke und den Verlauf der Hautprobe festzustellen. Nach ihren Angaben hatte das Polysaccharid keinerlei antigene Wirkung, weder

eine agglutinierende noch neutralisierende. Bei brucellose-infizierten Rindern fielen die Kutanteste deutlich positiv aus, führten aber sonst zu keinen bedeutsamen Nebenerscheinungen. Als die für den Hauttest am besten geeignete Konzentration bezeichneten sie 0,75 mg Polysaccharid, gelöst in 0,2 ccm physiologischer NaCl. In weiteren Versuchen sahen sie, daß Agglutinine bereits zwei Wochen p. inf. im Blutserum nachzuweisen waren, während Präcipitation und Hauttest erst in der 5. Woche positiv ausfielen. Die Autoren folgerten daraus, daß der Wert des Kutantests zur Frühdiagnose zwar gering sei, er aber für die heute geübte Diagnostik der Rinderbrucellose doch eine Ergänzung darstelle.

Ottosen und Plum (29) entwickelten ebenfalls ein nicht antigenes Allergen (PEBA = Purified Extract of Brucella Abortus), mit dem sie ausgedehnte Untersuchungen an Rindern vornahmen. Sie konnten feststellen, daß bei frisch infizierten Beständen die Ergebnisse der Intrakutan- und der serologischen Proben gut übereinstimmten, während in chronisch infizierten Herden eine beträchtliche Diskrepanz auftrat. Sie schließen daraus, daß die PEBA-Probe zur Ermittlung verseuchter Tiere in neuinfizierten Beständen und evtl. im Verein mit der ABR-Probe zur routinemäßigen Kontrolle brucellosefreier Bestände angewandt werden könne.

Niznánsky, Kreméry und Ofúkaný (28) berichten über die Herstellung, Bewertung und praktische Anwendbarkeit der aus verschiedenen Stämmen hergestellten Mosimannschen Brucellapolysaccharide. Ihre ausgedehnten Versuche an Rindern ergaben zufriedenstellende Ergebnisse. In dem verhältnismäßig komplizierten und langwierigen Arbeitsvorgang bei der Gewinnung des Polysaccharids sehen sie jedoch einen großen Nachteil. Außerdem fordern sie eine Standardisierung der Polysaccharidherstellung. Trotz übereinstimmender Ergebnisse verlangen sie die Einführung der komplexen Diagnose (serologische Untersuchungen, ABR und Kutantest), um so die Sicherheit der Feststellung von Brucelloseinfektionen zu erhöhen.

Bühlmann (4) prüfte 1956 an einer großen Zahl von vakzinieren und natürlich infizierten Rindern das Brucellin "Berna" von Mosimann und das Allergen PEBA von Ottosen und Plum. Er konnte feststellen, daß die Intrakutanprobe mit beiden Allergenen weder für die Abklärung sog. Impftiter noch zur Erfassung infizierter Tiere geeignet ist. Die Zuverlässigkeit der allergischen Untersuchungsmethode reichte nicht an die bisher gebräuchlichen serologischen und bakteriologischen Methoden heran. Außerdem waren die Symptome der positiven Hautreaktion nur gering ausgeprägt: bei Brucellin "Berna" im Durchschnitt 1,36 mm,

bei PEBA 1, 17 mm Hautschwellung. Bühlmann hält deshalb diese Allergene, obwohl sie gegenüber anderen zweifellos Vorteile besitzen, für die Diagnose der Rinderbrucellose nicht geeignet. Auch Jendrusch (19), der Versuche an Kaninchen, Rindern und Schweinen mit den gleichen Allergenen durchführte, gelangte zu denselben Ergebnissen. Er erklärte, daß die uneinheitlichen, von der Serodiagnostik abweichenden Reaktionen die allgemeine Anwendung beider Allergene zur Bangdiagnose vor allem bei Rindern verbiete. Anderer Meinung ist Bederke (2), der das Brucellin "Berna" auf seine Verwendungsmöglichkeit als Kutantest in der Praxis ebenfalls prüfte. In seinen Versuchen konnte er die Ergebnisse von Mosimann, Bürki und Margadant (5) bestätigen. Er stellte fest, daß das Allergen nicht agglutinogen und atoxisch ist. Außerdem erbrachten alle serologisch positiven Rinder im Kutantest positive Hautreaktionen. Er schließt daraus, daß das Brucellin "Berna" ein brauchbares Allergen ist, das im Rahmen der komplexen Brucellosediagnostik Verwendung finden sollte.

III. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Die vielen im Schrifttum angeführten sehr unterschiedlichen und zum Teil sich widersprechenden Ergebnisse zeigen, daß die gebräuchlichen serologischen Untersuchungsmethoden zweifellos noch nicht durch die Allergieprobe ersetzt werden können. Allen entwickelten Allergenen haften bisher Mängel an, die ihre Verwendung in der Praxis verbieten.

Meine Aufgabe war es nun, ein im Tierhygienischen Institut von Wolf hergestelltes Brucellen-Polysaccharid auf seine antigenen und allergenen Eigenschaften an Meerschweinchen und Rindern zu untersuchen.

A. Material und Methodik

1. Herstellung der Polysaccharidfraktion (1)

Insgesamt 300 Kolleschalen, die je 120 ml gewöhnlichen Agar enthielten, wurden mit einer Brucellenaufschwemmung des Stammes Buck 19 beimpft. Vor der Beimpfung ist die Keimsuspension stets morphologisch und kulturell auf Reinheit geprüft worden. Nach 48- bis 72stündem Verweilen im Brutschrank bei 37° C wurde jede Kolleschale mit etwa 5 ccm steriler Kochsalzlösung abgeschwemmt und die so erhaltene Keimaufschwemmung einer erneuten Reinheitsprüfung unterzogen. Insgesamt gewann ich auf diese Weise ca. 1500 ccm. Je 70 ccm dieser Keimsuspension wurden dann mit der gleichen Menge konzentrierter HCl 35 Minuten lang im Rückflußkühler hydrolysiert. Während dieses Vorgangs änderte sich die anfangs hellbraune milchige Flüssigkeit und wurde schließlich schwärzlich klar. Der pH-Wert betrug um 1. Die Flüssigkeit wurde dann nach Zugabe der doppelten Menge Aq. dest. im Polyäthylenschlauch unter fließendem Wasser 72 Stunden dialysiert (pH = 7) und danach lyophilisiert. Es entstand ein dunkelbraunes Pulver, das rissig am Boden der Gefäße lag und sich leicht in sterilem Aq. dest. löste. Nach 30minütigem Zentrifugieren bei 3500 Umdrehungen/Min. bildete sich ein schwarzer Bodensatz, die überstehende Flüssigkeit war rotbraun. Diese wurde abgeschüttelt und zur Eiweißfällung mit Trichloressigsäure versetzt. Erneutes 10 Minuten langes Zentrifugieren ließ einen geringen, bräunlich schlierigen Bodensatz ent-

1) Wolf, G.: Beitrag zur Polysaccharid-Extraktion aus *Brucella abortus*
Vet. med. Diss. München 1959 (unveröffentlicht)

stehen, der verworfen wurde. Die klare, rotbraune Flüssigkeit wies eine pH von 1 auf. Sie wurde daher nochmals dialysiert (pH = 7) und anschließend wiederum lyophilisiert. Die Gesamtmenge des aus diesem Arbeitsgang erhaltenen Polysaccharids betrug 200 mg. Das so entstandene hellbraun bis beige, stark hygroskopische Pulver stimmte sowohl im Aussehen als auch in seinen chemischen Eigenschaften mit dem von Wolf hergestellten Polysaccharid überein.

Ergänzend zu den Untersuchungen von Wolf wurde noch eine papierchromatographische Bestimmung der das Polysaccharid bildenden Monosaccharide versucht. Dazu wurden 15 mg Polysaccharid, gelöst in 2 ccm Aq. dest., einer 10stündigen Hydrolyse mit 2 ccm konzentrierter HCl im Rückflußkühler unterworfen. Danach wurde die Lösung 24 Stunden unter fließendem Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das so gewonnene rein weiße, stark hygroskopische und leicht wasserlösliche Pulver ist dann im Chemischen Institut der Universität München papierchromatographisch untersucht worden (1).

Als Lösungsmittel wurde Butanol-Dimethylformamid-Wasser im Verhältnis 2 : 1 : 1 verwandt.

Entwickler: Anilin/Phtalat

Laufzeit: 24 Stunden

Temperatur: 20° C

Das Trocknen erfolgte bei 105° C 10 Minuten lang.

Vergleichsweise wurden folgende bekannte Monosaccharide auf das Papier aufgetragen: d-Manose, Lactose, d-Fructose, Galactose, d-Glukose und l-Sarbose.

E r g e b n i s s:

Es war zu erkennen, daß sich die unbekannte Substanz in gleicher Höhe mit der d-Glukose befand. Sie war allerdings auf dem Chromatographiepapier im Gegensatz zu den bekannten Monosacchariden nur im durchscheinenden Licht als Färbung deutlich zu erkennen. Der Grund dafür lag nach Ansicht der Chemiker in der zu grob durchgeführten Hydrolyse mit konzentrierter HCl, bei der vermutlich auch ein großer Teil der Monosaccharide zerstört worden ist.

-
- 1) Dem Chemischen Institut der Universität München gebührt besonderer Dank für die Durchführung der Analyse.

2. Tiermaterial

Zu den Versuchen standen mir insgesamt 33 Meerschweinchen und 4 Rinder zur Verfügung. 24 Meerschweinchen wurden im Verlaufe der Untersuchungen mit dem virulenten Brucellenstamm 544 infiziert; 3 Rinder sind im Laufe anderer Versuche ebenfalls mit dem Stamm 544 infiziert worden und wiesen Bluttitern von 1 : 640 ++++ auf. 1 Rind war frei von Brucellose.

Nähere Angaben über die Technik der Untersuchungen sind der besseren Übersicht wegen den jeweiligen Versuchsreihen vorangestellt.

B. Versuchsergebnisse

1. Sensibilisierungsversuch an Meerschweinchen

Von großer Bedeutung für alle folgenden Versuche war es, zu wissen, ob das Buck 19-Polysaccharid bei intrakutaner Verabreichung antigen wirkt, d. h. ob nach Injektion von verhältnismäßig hohen Dosen bei gesunden Tieren in der Blutserum-Langsamagglutination Titer auftraten.

Um dies zu bestimmen, wurden 3 bang-negative Meerschweinchen (Nr. 496, 497, 498) viermal im Abstand von zwei Tagen mit je 0,5 mg des Polysaccharids, gelöst in 0,1 ccm physiologischer NaCl-Lösung, intrakutan geimpft. Die Gesamtmenge des verabreichten Polysaccharids betrug pro Tier 2,0 mg.

8 Tage sowie 2 und 3 Wochen nach der letzten Injektion wurde den Tieren durch Herzpunktion Blut entnommen und mit den gewonnenen Seren eine Langsamagglutination durchgeführt.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Tabelle 1 zusammengefaßt worden.

Der negative Ausfall der Blutserum-Langsamagglutination beweist, daß das Polysaccharid im Organismus keine Antikörper bildet, also keinerlei antigene Eigenschaften besitzt. Weiterhin konnte ich bei den behandelten Tieren keine Störung des Allgemeinbefindens beobachten, was für die Atoxizität des Polysaccharids spricht.

Tabelle 1 Ausfall der Langsamagglutination nach intra-
kutaner Verabreichung des Polysaccharids

Ausfall der Langsam-Agglutination				
Meerschw. Nr.	bei Serum- verdünnung	1. Woche p. inj.	2. Woche p. inj.	3. Woche p. inj.
496	1 : 5	-	-	-
	1 : 10	-	-	-
	1 : 20	-	-	-
	1 : 40	-	-	-
	1 : 80	-	-	-
	1 : 160	-	-	-
497	1 : 5	-	-	-
	1 : 10	-	-	-
	1 : 20	-	-	-
	1 : 40	-	-	-
	1 : 80	-	-	-
	1 : 160	-	-	-
498	1 : 5	-	-	-
	1 : 10	-	-	-
	1 : 20	-	-	-
	1 : 40	-	-	-
	1 : 80	-	-	-
	1 : 160	-	-	-

Die bis jetzt erhaltenen Ergebnisse entsprechen den ersten Anforderungen, die von Landsteiner (zit. nach 37) an ein Hapten gestellt werden: "Es besitzt nicht die Fähigkeit, im Organismus selbst Antikörper zu bilden."

2. Versuch, das Polysaccharid durch Adsorption an $\text{Al}(\text{OH})_3$ zu einem Vollantigen zu machen

Nach Schmidt (37) können Haptene in geeigneter Weise zu Vollantigenen aktiviert werden. Der Mechanismus der Haptenaktivierung ist jedoch noch in wesentlichen Punkten ungeklärt. Die Ansichten verschiedener Autoren darüber widersprechen sich zum Teil. So entsteht nach Landsteiner bei der Mischung von Hapten mit Eiweiß ein neuartiger antigener Komplex. Sachs (31) entwickelte die sog. Schleppertheorie, die besagt, daß ein Hapten, das man vor der Injektion mit körperfremdem Eiweiß zusammenbringt, von diesem zum Orte der Antikörperbildung "geschleppt" wird. Doerr und Hallauer (8) sprechen von einer "Aktivierung" des Haptens durch physikalische Bindung.

Landsteiner und Simms (22) fanden Kombinationsimmunisierung mit Schweineserum besonders geeignet, wobei das Hapten mit dem Schweineserum in vitro gemischt und zusammen injiziert werden muß. Es tritt dabei eine nebenvalenzartige Bindung ein (Adsorption), wobei das Hapten als Adsorbens dient. Nach Schmidt (37) lassen sich aber Haptene mit vorwiegender oder alleiniger Polysaccharidnatur auf diese Weise nicht aktivieren, da sie nicht adsorptiv wirken. Wolf (42) versuchte, das Buck 19-Polysaccharid durch Bindung an Schweineserum zu einem Vollantigen zu aktivieren. Dies mißlang jedoch, und er zog daraus die Schlußfolgerung, daß es sich um ein hochgereinigtes Hapten handle, dem jede eigene antigene Wirkung fehlte.

Die zweite Möglichkeit der Adsorption an ein inertes Material, z. B. Kaolin, $\text{Al}(\text{OH})_3$, wobei letzteres als Adsorbens wirkt, überprüfte ich in dem folgenden Versuch. Dabei ging ich von der Schmidtschen Annahme aus, daß nur durch Vergrößerung des Gesamtkomplexes bei gleichbleibender chemischer Natur das Polysaccharid zu einem Vollantigen aktiviert werden kann.

Material und Methodik

15 mg des aus *Brucella abortus*, Stamm Buck 19 hergestellten Polysaccharids wurden in 5 ccm Aq. dest. gelöst und mit 1 ccm Aluminiumhydroxyd 2%ig gemischt. (Bei dieser Versuchsanordnung arbeitete ich in Anlehnung an die Herstellungsvorschrift für Rotlaufadsorbatimpfstoff.) Nach Zugabe des sterilisierten $\text{Al}(\text{OH})_3$ schüttelte ich die Suspension kräftig durch und ließ sie 6 Tage kühl und dunkel stehen. Zweimal täglich wiederholte ich jedoch in dieser Zeit das heftige Durchschütteln, um so eine vollkommene Adsorption zu er-

Der negative Ausfall der Agglutination und der Präzipitation zeigt, daß es nicht gelungen ist, das Polysaccharid durch Adsorption an $Al(OH)_3$ zu einem Vollantigen zu aktivieren. Von ähnlichen Ergebnissen berichtete Schmid (37), dem der Versuch, das Wassermann-Antigen durch $Al(OH)_3$ zu einem Vollantigen zu adsorbieren, mißglückte. Er schloß daraus, daß nicht jedes Hapten durch Adsorption an ein inertes Material aktiviert werden kann. Die Untersuchungen von Jakobs (18) zeigten ebenfalls, daß ein hochgereinigtes Hapten, dem jede eigene antigene Wirkung genommen wurde, durch Kaolin nicht zu einem Vollantigen komplettiert werden konnte. Offensichtlich hat es sich bei dem von mir untersuchten Brucellen-Polysaccharid nun auch um ein solches hochgereinigtes Präparat gehandelt. Der Umstand, daß auch nach Verabreichung des Polysaccharid- $Al(OH)_3$ -Adsorbates keine spezifische Antikörperbildung einsetzte, findet auf diese Weise seine Erklärung.

3. Intrakutanproben mit dem Brucellen-Polysaccharid an bang-infizierten Meerschweinchen

a) Bestimmung der Gebrauchsdosis

Die Untersuchungen hatten den Zweck, bei gesunden Tieren die Dosis zu ermitteln, die nach intrakutaner Injektion reaktionslos vertragen wurde. Dadurch sollte verhindert werden, daß unter Umständen bei infizierten Tieren Hautreaktionen fälschlicherweise als positiv betrachtet wurden.

Aus dem in Pulverform vorliegenden bräunlichen Polysaccharid wurden Verdünnungen hergestellt, die in 0,1 ccm physiologischer NaCl-Lösung folgende Mengen enthielten: 1 mg, 0,5 mg, 0,1 mg und 0,05 mg.

Da die Lösungen einen stark alkalischen pH-Wert aufwiesen (9), wurden sie vor der Applikation mit Hilfe des sauren Sörensen-Puffers (Acidum boricum) auf den pH 6,8 eingestellt.

An 2 weiße, bangnegative Meerschweinchen wurde nun nach Scheren und Enthaaren der Tiere mit einem Bariumsulfitbrei je 0,1 ccm dieser vier Konzentrationen intrakutan verabreicht. Zur Kontrolle diente die Injektion von 0,1 ccm physiologischer NaCl (5 Impfstellen).

Die Ablesung und Beurteilung der Hautreaktionen erfolgte zwischen 12 und 24 Stunden. Dabei wurde geachtet auf den Durchmesser der Entzündungsfläche, den Grad der Rötung, Schwellung und Nekrose der Haut.

Die Beurteilung erfolgte nach folgendem Schema:

+	geringgradige Rötung bzw. Schwellung			
++	mittelgradige "	"	"	"
+++	hochgradige "	"	"	"

Das Ergebnis ist aus Tabelle 3 zu ersehen.

Tabelle 3 Bestimmung der Gebrauchsdosis an gesunden Meerschweinchen.

Meerschw. Nr.	Intrakutane Dosis	Ø der Ent- zündung	Hautreaktion		
			Rötung	Schwellung	Nekrose
1	1,0 mg	7,0 mm	+++	++	+ 2,5 mm
	0,5 mg	5,0 mm	++	+	+ 1,5 mm
	0,1 mg	4,5 mm	+	-	-
	0,05 mg	3,0 mm	+	-	-
	0,1 ccm NaCl	3,5 mm	+	-	-
2	1,0 mg	6,0 mm	++	++	+ 2,5 mm
	0,5 mg	4,5 mm	++	+	+ 2,0 mm
	0,1 mg	4,5 mm	+	-	-
	0,05 mg	3,0 mm	+	-	-
	0,1 ccm NaCl	3,5 mm	+	-	-

Die beiden Konzentrationen 0,5 und 1,0 mg/0,1 ccm NaCl erwiesen sich für den Intrakutantest als unbrauchbar, da sie zu erheblichen Nekrosen führten. Die Verdünnung 0,1 mg/0,1 ccm NaCl wurde als noch reaktionslos verträglich erkannt und als Gebrauchsdosis für weitere Versuche an Meerschweinchen festgelegt.

b) Untersuchung des Polysaccharids auf seine Eignung für den Kutantest bei infizierten Meerschweinchen

24 weißen Meerschweinchen wurde je 1 ccm einer Suspension des hochvirulenten Abortus Bang Stammes 544 (Dichte $15 \frac{7}{\text{ccm}}$) subcutan in die Kniefalte injiziert. Die infizierten Tiere wurden dann folgendermaßen getestet: In Abständen von je einer Woche nach der Infektion entnahm ich jeweils drei Tieren Blut und bestimmte den Agglutiningehalt des Serums. Gleichzeitig wurden sie mit dem eigenen Buck 19 Polysaccharid und zur Kontrolle mit dem von Mosimann entwickelten Brucellin Bema (0,1 mg/0,1 ccm NaCl) intracutan geprüft. Als Kontrolle diente wiederum 0,1 ccm physiologische NaCl-Lösung. Die Ablesung der Hautreaktion erfolgte zwischen 12 und 24 Stunden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 4 und 5 zusammengestellt worden.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß mit der Langsamagglutination bereits 2 Wochen p. i. eine ausgeprägte Infektion nachzuweisen war. Der Titer stieg in der 4. Woche auf 1:640 ++++ und blieb für die Zeit des Versuchsablaufs auf annähernd konstanten Werten.

Der Kutantest jedoch, wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, fiel sowohl mit dem eigenen Polysaccharid als auch mit dem zur Kontrolle benützten Brucellin Bema negativ aus. Es konnten zwar Entzündungen mit geringer Rötung und Schwellung beobachtet werden, jedoch waren diese im Vergleich zur NaCl-Injektion zu gering, um sie mit Sicherheit am Einzeltier als positiv beurteilen zu können.

Tabelle 4 Ausfall der Langsamagglutination bei bang-infizierten Meerschweinchen

Meer- schw. Nr.	Wochen p. i.	Langsamagglutination					
		Serumverdünnung					
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
452	2	++++	++++	++++	++	+	-
420		++++	++++	++	+	-	-
40		++++	++++	++++	++	-	-
453	3	++++	++++	++++	++	+	-
455		++++	++++	++++	+	-	-
457		++++	++++	++++	++++	+	-
701	4	++++	++++	++++	++++	++++	++++
702		++++	++++	++++	++++	++	-
714		++++	++++	++++	++++	++++	++++
703	5	++++	++++	++++	++++	++++	++++
704		++++	++++	++++	++++	++++	+
707		++++	++++	++++	++++	++++	++
454	6	++++	++++	++++	++++	++++	+++
459		++++	++++	++++	++++	++++	+
709		+++	++++	++++	++++	+++	+++
708	7	++++	++++	++++	+++	+++	+++
710		++++	++++	++++	+++	++	++
44		+++	+++	+++	++	++	+
45	8	++++	++++	++++	+++	+++	+
49		+++	++++	++++	+++	+++	+++
50		++++	++++	++++	+++	+++	++

Tabelle 5 Vergleichende Intrakutanprobe bei banginfizierten Meer-
schweinchen mit Brucellen-Polysaccharid und Brucellin-
Berna

Meerschw. Nr.	Wochen p. i.	Brucellen-Polysaccharid					Ha
		Ø Entz.	Rötung	Schwellung	Nekrose	Ø Entz.	
40	2	4,5	+	+	-	4,5	
420		2,5	+	-	-	3,0	
452		4,5	+	-	-	4,5	
453	3	5,5	+	+	-	4,5	
455		5,0	+	+	-	3,0	
457		7,0	+	++	-	4,5	
701	4	9,0	+	+++	-	5,0	
702		7,0	+	+	-	6,0	
714		3,0	+	-	-	3,5	
704	5	9,0	+	++	-	5,0	
703		6,5	+	+	-	6,5	
707		4,0	+	-	-	3,0	
454	6	6,0	+	+	-	8,5	
459		6,5	+	+	-	5,5	
709		7,0	+	++	-	2,2	
708	7	6,5	+	++	-	6,0	
710		7,0	+	++	-	7,0	
44		5,0	+	+	-	4,5	
45	8	9,0	++	++	-	8,0	
49		5,0	+	+	-	4,5	
50		4,0	+	+	-	6,5	

reaktion

Brucellin-Berna

Physiol. NaCl-Lösung

ötung Schwellung Nekrose Ø Entz. Rötung Schwellung Nekrose

	+	-	4,0	+	+	-
	-	-	4,0	+	-	-
	-	-	4,5	+	-	-
	-	-	4,5	+	-	-
	+	-	2,0	-	-	-
	+	-	3,0	+	-	-
+	+	-	2,0	+	-	-
	+	-	2,5	+	-	-
	-	-	1,5	+	-	-
	+	-	7,5	+	-	-
	+	-	6,0	-	-	-
	-	-	3,0	-	-	-
	+	-	4,0	-	-	-
	+	-	3,5	-	-	-
	+	-	2,5	-	-	-
	+	-	3,0	+	-	-
+	++	-	3,5	-	-	-
	+	-	2,5	+	+	-
+	+	-	3,5	+	+	-
	+	-	2,0	-	-	-
	+	-	2,5	+	-	-

4. Intrakutanproben mit dem Brucellen-Polysaccharid an Rindern

Aus dem Buck 19-Polysaccharid und physiologischer NaCl stellte ich eine Lösung her (pH = 6,9), die in je 0,1 ccm 0,75 mg enthielt. Zum Vergleich wurde wiederum Brucellin Berna (0,75 mg in 0,2 ccm) und, um eventuelle unspezifische Reaktionen ausschließen zu können, physiologische Kochsalzlösung mit getestet.

Für meine Versuche standen mir 3 infizierte Rinder (Nr. 28, 29 und 31), die positive Titer von 1:640 ++++ aufwiesen und ein bang-freies Tier (Nr. 33) zur Verfügung. Bei der Intrakutanprobe wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Scheren und Reinigen maß ich mit dem Kutimeter die Hautdicke an der Schulter und zwar für jede vorausgesehene Stichstelle (pro Tier 3) besonders. Danach wurden jedem Rind 0,1 ccm Polysaccharid-Lösung, 0,1 ccm physiol. NaCl und 0,2 ccm Brucellin Berna intracutan appliziert. Alle 3 Injektionen erfolgten an der gleichen Schulter im Abstand von etwa 8 cm.

Die Ablesungen führte ich nach 6, 12 und 24 Stunden durch. Es wurde dabei besonders auf Schwellung, Schmerzempfindlichkeit und auftretende Nekrosen geachtet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt worden.

Obwohl in diesem Versuch nur wenige Tiere getestet wurden, beweisen die erhaltenen Ergebnisse doch, daß weder das Buck 19-Polysaccharid noch das Brucellin-Berna im Kutantest die Banginfektion mit deutlichen Reaktionen zeigte. Schwellungswerte waren bei beiden Allergenen sehr gering und lagen nur unerheblich über den nach Injektion von physiol. NaCl-Lösung zustande gekommenen Werten. Auch die Schmerzempfindlichkeit an der Injektionsstelle war stets nur sehr undeutlich ausgeprägt. Nekrosen traten auch in späterer Zeit bei keinem der Tiere auf. Auch Allgemeinstörungen blieben aus.

Tabelle 6 Vergleichende Intrakutanprobe an Rindern mit Brucellen-
Polysaccharid und Brucellin-Berna

Kuh- Nr.	Agglut. Titer	Hautreaktion									
		Stdn. p. i.		Brucellen-Polysaccharid		Brucellin-Berna		Phys. NaCl-Lösung			
		HDZ	Dolor	HDZ	Dolor	Nekr.	Dolor	Nekr.	HDZ	Dolor	Nekr.
28	1:640	0,2	+	-	0,2	+	-	-	0,2	-	-
	++++		-								
	12	0,4	+	-	0,4	+	-	-	0,2	+	-
	24	0,5	-	-	0,6	+	-	-	0,3	-	-
29	1:640	0,4	-	-	0,3	-	-	-	0,2	-	-
	++++										
	12	0,8	-	-	0,7	-	-	-	0,3	-	-
	24	0,9	+	-	0,8	+	-	-	0,2	-	-
31	1:640	0,2	-	-	0,2	-	-	-	0,2	-	-
	++++										
	12	0,3	+	-	0,4	+	-	-	0,1	-	-
	24	0,6	-	-	0,6	-	-	-	0,1	-	-
33	1:20 -	0,2	-	-	0,1	-	-	-	0,2	-	-
	12	0,1	-	-	0,2	-	-	-	0,1	-	-
	24	0,1	-	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-

IV. D i s k u s s i o n

Im Laufe der letzten Jahre sind zahlreiche Versuche durchgeführt worden, um die weit verbreitete Rinderbrucellose auch auf allergischem Wege zu diagnostizieren.

Grundlegend für alle diese Arbeiten waren die Untersuchungen Heidelbergers (13), der gefunden hatte, daß die Polysaccharidfraktionen von Mikrobenzellen als Träger der Spezifität für das immunbiologische Geschehen eine bedeutende Rolle spielten. Niznansky (28) verglich die Wirkung der Polysaccharide mit der der Koenzyme der prosthetischen Gruppen von Enzymen, die für die Spezifität der Enzyme verantwortlich sind.

Für die praktische Anwendung von Allergenen zu diagnostischen Zwecken ist es von größter Bedeutung, daß solche Stoffe Hapten-Charakter besitzen. Als Haptene bezeichnet man bekanntlich Substanzen, die im Organismus selbst keine Antikörper zu bilden vermögen, mit vorhandenen Antikörpern aber in spezifischer Weise reagieren können. Wie aus der Literaturübersicht hervorgeht, entsprechen die bisher in der Brucellosediagnostik angewandten Polysaccharide diesen Anforderungen nur zum Teil.

1949 bewies Mosimann (72) experimentell, daß eine von ihm dargestellte Polysaccharidfraktion von Brucellen alle Eigenschaften eines Haptens besaß und daher für den allergischen Intradermaltest geeignet war. Verschiedene Autoren (Bürki, Margadant (5), Niznansky, Krcmery, Ofukany (28), Jendrusch (19), Bühlmann (4), Bederke (2)) überprüften dieses Mosimannsche Allergen (Brucellin-Berna), erhielten aber zum Teil sich widersprechende Ergebnisse. Niznansky (28), der verhältnismäßig günstige Erfolge erzielte, sieht einen großen Nachteil in der komplizierten und langwierigen Gewinnung des Polysaccharids. Außerdem fordert er die standardisierte Herstellung, ohne die man für die gleiche Qualität der einzelnen Produkte nicht bürgen könnte. Bühlmann (4) lehnte den Kutantest mit Brucellin-Berna als völlig unbrauchbar ab. Er erkannte bei seinen Rinderversuchen, daß unter 130 serologisch positiven Tieren nur 39 % eine genügende Hautdickenzunahme zeigten. Bei Grenztitern von 1 : 80 trat überhaupt nie, bei Endtitern von 1 : 160 und 1 : 320 nur in wenigen Fällen eine positive Reaktion auf.

Auch in meinen Versuchen mit infizierten Meerschweinchen und Rindern, bei denen serologisch Titer von 1 : 640 ++++ und höher nachgewiesen worden waren, konnte ich mit Brucellin-Berna keine positiven Hautreaktionen beobachten. Bei banginfizierten Rindern kam es nur zu geringgradigen Hautschwellungen (maximum 0,8 mm), die nur unbedeutend stärker waren als bei der Kontrollinjektion von physiologischer NaCl-Lösung. Meine Versuche scheinen damit, ebenso wie die von Bühlmann (4) zu zeigen, daß der Kutantest mit Brucellin-Berna keine Ergänzung der Serologie darstellt und deshalb für die tierärztliche Praxis kaum brauchbar sein dürfte.

Dasselbe gilt auf Grund meiner Versuche auch für das nach dem Verfahren von Wolf (42) hergestellte Brucella-Polysaccharid. Diese aus Brucellen des Stammes Buck 19 gewonnene Substanz habe ich in der vorliegenden Arbeit auf ihre antigenen und allergenen Eigenschaften untersucht. Dabei erkannte ich, daß auch große Mengen des Polysaccharids im einverleibten Organismus keine Antikörper produzierten. Die Blutserumlängsamagglutination ergab sowohl vor als auch nach der intrakutanen Applikation des Polysaccharids negative Titerwerte. Die nicht antigene Eigenschaft entsprach somit der ersten Anforderung, die von Schmidt (37) an ein Hapten gestellt wird: "Es besitzt nicht die Fähigkeit, selbst Antikörper zu bilden." Weiterhin wurden Versuche unternommen, das als Hapten wirkende Polysaccharid durch Adsorption an einen Träger zu einem Vollantigen zu aktivieren. Zu diesem Zweck mischte ich das Buck 19-Polysaccharid mit 2%igem Al (OH)₃ und injizierte das "Adsorbat" an bangnegative Meerschweinchen. Die nach 3 und 4 Wochen durchgeführten serologischen Proben fielen jedoch negativ aus. Es waren weder agglutinierende noch präzipitierende Antikörper im Blut nachweisbar. Auch Wolf (42), der ähnliche Versuche mit einer Polysaccharid-Schweineserum-Mischung durchführte, erhielt negative Ergebnisse. Das aus Brucellen gewonnene Polysaccharid war also weder in der Lage, Eiweiß (Schweineserum) zu adsorbieren, noch mit Aluminiumhydroxyd eine Verbindung einzugehen. Es kann also auf diese Weise nicht zu einem Vollantigen aktiviert werden. Als Erklärung dafür kann einmal die Behauptung von Schmidt herangezogen werden, daß Haptene mit vorwiegender oder alleiniger Polysaccharidnatur nicht mit Eiweiß zu einem Vollantigen gemacht werden können. Zum anderen bewies Jakobs (18), daß auch Kaolin und Al (OH)₃ zur Aktivierung eines hochgereinigten Haptens unfähig waren. Jakobs (18) schloß daraus, daß ein Hapten nur dann durch Adsorption an inertes Material zu einem Vollantigen aktiviert werden kann, wenn es noch einen geringgradig antigen wirkenden Anteil besitzt. Danach ist der Schluß berechtigt, daß es sich bei der aus Brucellen des Stammes Buck 19 hergestellten Substanz, die in meinen Versuchen verwendet wurde, um ein hochgereinigtes Polysaccharid handelte,

das überhaupt keine eigenen antigenen Eigenschaften mehr besaß.

Die Polysaccharidnatur dieser Fraktion wurde bereits von Wolf (42) beschrieben. Ergänzend dazu habe ich auch versucht, die einzelnen an dem Polysaccharid beteiligten Monosaccharide festzustellen. Es wurde daher nach weiterer Hydrolyse eine papierchromatographische Bestimmung durchgeführt, bei der sich ergab, daß die fragliche Substanz mit der d-Glukose identisch war. Zwar war nach diesem Verfahren nur im durchscheinenden Licht eine deutliche Färbung zu erkennen, doch war dies vermutlich auf die von mir zu grob durchgeführte Hydrolyse zurückzuführen, bei der auch ein großer Teil der Monosaccharide zerstört worden war. In der Literatur ist bisher ein ähnlicher Versuch nur von Niznansky (28) beschrieben worden, der eine papierchromatographische Bestimmung des Mosimannschen Polysaccharids durchgeführt hat. Dabei erhielt er Spuren von 3 Zuckerarten: Glukose, Galaktose und einen Aminosucker. Niznansky (28) betrachtete die erhaltenen Ergebnisse jedoch mit einiger Zurückhaltung, da auch seine Methode eine nicht ausreichende Genauigkeit besaß.

In weiteren Versuchen überprüfte ich die allergene Wirkung des Polysaccharids im Intrakutantest. Es galt hier, die zweite Forderung von Landsteiner (zit. nach 42), die an ein Hapten gestellt wird, nachzuweisen, nämlich die Forderung, mit bereits vorhandenen Antikörpern eine spezifische Verbindung einzugehen. Infizierte Meerschweinchen, die eine hohen Agglutinationstiter aufwiesen, reagierten jedoch auf die intrakutane Verabreichung des Brucella-Polysaccharids nicht deutlich. Die nach 6 bis 12 Stunden aufgetretene Entzündung mit Rötung und Schwellung war in den meisten Fällen zu undeutlich, als daß man sie am Einzeltier als positiv hätte bezeichnen können. Auch in Versuchen mit einigen banginfizierten Rindern (Titer 1 : 640 +++) kam es zu keinen eindeutigen Hautreaktionen. Die Zunahme der Hautdicke betrug in keinem Falle, weder nach 12 noch nach 24 Stunden, mehr als 1,0 mm.

Zusammenfassend ergibt sich somit, daß das nach der Methode von Wolf aus Brucellen gewonnene Polysaccharid nicht fähig ist, mit vorhandenen Antikörpern eine spezifische Verbindung einzugehen. Man kann es deshalb für den Kutantest als ergänzendes Diagnostikum der Brucellose nicht verwenden. Entgegen den Erwartungen hat in meinen Versuchen an banginfizierten Meerschweinchen und Rindern aber auch das Brucellin-Berna, ein von Mosimann hergestelltes Polysaccharid-Präparat, keine positiven Hautreaktionen hervorgerufen. Es erscheint daher der Schluß berechtigt, daß zur Zeit allergische

Hautproben mit Polysaccharid-Extrakten zur Diagnose der Rinderbrucellose noch nicht als praxisreif angesehen werden können.

V. Zusammenfassung

1. Nach der Methode von Wolf (42) wurden aus Brucellen des Stammes Buck 19, die in Kolle-Schalen auf gewöhnlichem Nähragar gezüchtet worden waren, insgesamt 200 mg einer polysaccharidartigen Substanz gewonnen.
2. Bei gesunden, bangnegativen Meerschweinchen, denen eine große Menge Polysaccharid (2 mg) injiziert wurde, traten im Serum keine agglutinierende Antikörper auf.
3. Der Versuch, das Polysaccharid durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd zu einem Vollantigen zu aktivieren, mißlang.
4. Bei banginfizierten Meerschweinchen fiel der Intrakutantest mit dem gelösten Polysaccharid (0,1 mg in 0,1 ccm) und dem als Kontrolle verwandten von Mosimann entwickelten Brucellin-Berna (0,1 mg in 0,1 ccm) negativ aus.
5. Auch bei 3 infizierten Rindern, die Titer von 1 : 640 ++++ aufwiesen, konnten weder mit dem eigenen Polysaccharid noch mit dem Brucellin-Berna positive Reaktionen erzielt werden.

VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Baumgartner, H.: (Labor des Bernischen Milchverbandes)
Erfahrungen mit der Brucellenzüchtung
auf dem "Milieu W"
Schweiz. Arch. Tierhk. 97, 357 (1955)
2. Bederke, G.: Über den diagnostischen Wert der intra-
kutanen Allergieprobe bei der Brucellose
des Rindes
Mh. Tierhk. 10, 71 - 79 u. 81 - 92 (1958)
3. Börger, K.: Vergleichende Prüfung einiger Nährböden
für die Brucellenzüchtung
Milchwissenschaft 12, 392 (1957)
4. Bühlmann, X.: Die Brauchbarkeit von Intrakutanproben
für die Diagnose der Rinderbrucellose
Vet. med. Diss. Zürich 1956
5. Bürki, F., Chr. Margadant,
W. Mosimann: Diagnose der Rinderbrucellose durch einen
Kutantest mit einem Polysaccharid-Aller-
gen aus *Brucella abortus*
Schweiz. Z. Path. Bakt. 18, 1147 (1955)
6. Diernhofer, K.: Zur Diagnose der Rinderbrucellose mit
der Intrakutanprobe
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 62, 401 (1955)
7. Dietl, G.: Zit. nach Bederke (2)
8. Doerr und Hallauer: Z. Immun. Forsch. 45, 170 (1926)
9. Ehksam, H. R.: Einige Untersuchungen über den Bang-
Agglutinationstiter frisch entnommener
Blutproben der Rindergattung
Schweiz. Arch. Tierhk. 99, 528-532 (1955)
10. Goetze, R.: Vorschläge und Wege zur Bekämpfung des
Abortus (Bang) des Rindes von Goetze und
Wagener
Hannover 1954

11. Habs, H. : Zit. nach Schaal (35)
12. Herter, R. : Phänomene und Probleme bei der serologischen Untersuchung (Aggl.) auf Rinderbrucellose
Mitt. f. Tierärzte 49/50 (1955), Bakteriolog. Institut Warthausen
13. Heidelberger, M.,
T. Oswald: The soluble specific substance of Pneumococcus
J. Exp. Med. 40, 14 (1924) New York
14. Holtum, M. : J. Comp. Path. Therap. 41 (1928)
15. Huddleson, I. F. : Brucellosis in Man and Animals
The Commonwealth Fund. New York 1943
16. Derselbe A comarison of culture mediums for growing strains of the genus Brucella
VI. Internat. Kongr. Microbiol. Rom 1953 VI., 139 - 140
17. Hutyra-Marek: Spezielle Pathologie und Therapie,
10. Aufl. I. Band, Jena (1954)
18. Jakobs, J. : J. Exp. Med. 59, 479 (1934)
19. Jendrusch, H. : Die Brauchbarkeit von allergischen Intrakutantesten zur Diagnose der Rinder- und Schweinebrucellose
Mh. Vet. Med. 12 (1957)
20. Jordan, C. F. : Symposium Brucellosis
Am. Ass. for the Advancement of Science 98 (1950)
21. Köser und Plate: Nachweis d. Brucella abortus in der Milch
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1934, 195 - 197
22. Landsteiner und Simms: Zit. nach Schmidt, H. (37)
23. Lippelt, H. : Maltafieber, Klinik und Therapie
Dtsch. Tropenmed. Zschr. 41, 91, 235 - 239 ()

24. Metzger, H. J.,
F. R. Beaudette and F. R. Stokes: The use of the incubating egg as a
differential medium
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 95, 158 (1939)
25. McCullough, N. B.: Symposium on Brucellosis
Am. Ass. for the Advancement of
Science 98 (1950)
26. Mingel: Zit. nach Schaal (35)
27. Mosimann, W.: Schweiz. Z. Path. Bakt. 12, 362 (1949)
28. Niznansky, F., V. I. Kromery
und I. Ofukany: Die Bereitung, Auswertung und prak-
tische Verwendbarkeit von Brucella -
polysacchariden in der komplexen
Diagnostik der Brucellose in der Praxis
Arch. Exp. Vet. Med. X, Leipzig 1956
29. Ottosen, H. E. und N.: Plum: Intradermal Brucellosis Tests in Cattle
with a non antigenic Agent
Report XIVth Internat. Vet. Congress
London 1949
30. Rolle, M.: Mikrobiologie und allgemeine Seuchen-
lehre. Lehrbuch für Tierärzte und
Studierende der Tiermedizin
Stuttgart 1949, S. 107
31. Sauter, R.: Läßt sich die intrakutane Probe zur
Feststellung des seuchenhaften Ver-
kalbens der Rinder verwerten?
Vet. med. Diss. Gießen 1929
32. Sachs, H.: Zbl. Bakt. 104, 128 (1927)
33. Smitmans, H. und T. Eschbaum: Beitrag zum Nachweis von Abortus
Bang-Bakterien in der Milch durch Tier-
versuche
Z. Inf. Krankh. d. Haustiere 57, 302-
310 (1941)

34. Spink, W. W., N. B.
McCullough and C. K. Mingle: Diagnostic criteria for human brucellosis
J. Am. Med. Assoc. 149, 805 - 808 (1952)
35. Schaal, E.:
Die Banginfektion des Menschen
Mitt. f. Tierärzte, Folge 31/34 (1954)
Bakteriolog. Institut Warthausen
36. Schimmelpfennig, K.:
Tierzüchterisch organisatorische Maßnahmen bei der Brucellose-Sanierung unserer Rinderbestände
Zuchthyg. Fortpfl. Störgn. Besamung d. Haustiere 12, 81 (1957)
37. Schmidt, H.:
Fortschritte der Serologie, 2. Neubearb.
Aufl., Darmstadt (1955)
38. Schulz, W.:
Über den diagnostischen Wert der Agglutination und Intrakutanprobe bei infektiösem Abortus der Kühe
Vet. med. Diss. Gießen 1912
39. Schumann:
Über die SSA-Methode bei der Abortus Bang-Diagnose
Mh. Vet. Med. 1948, 25
40. Stockmayer, W.:
Kulturelle Untersuchungen über die Ausscheidung von Bangbazillen mit der Milch
Z. Inf. Krankh. Haustiere 44, 105-128 (1933)
41. Weiß, K.:
Die Diagnostik der Banginfektion der Bullen unter besonderer Berücksichtigung der Spermauntersuchungen
Prakt. Tierarzt 1/1, 1 - 5 (1955)
42. Wolf, G.:
Beitrag zur Polysaccharid-Extraktion aus Brucella abortus
Vet. med. Diss. München 1959
(unveröffentlicht)
43. Wynnyckyj:
Über die Brauchbarkeit von Trockenantigenen bei der Brucella abortus Bang-Langsamagglutination und Meinicke Reaktion
Vet. med. Diss. München 1949

44. Zerfass, H., K. Fritsche,
E. Taylor und Schoregge:

Die Schafbrucellose in Rheinland-
Pfalz

Tierärztl. Umschau 9, 35 und 336 (1954)

Am Schlusse meiner Arbeit danke ich
Herrn Prof. Dr. A. M e y n
für die Überlassung des Themas.

Ferner gilt mein Dank Herrn
Dr. Th. S c h l i e ß e r
für die wohlwollende Unterstützung
und Durchsicht des Manuskriptes.

L E B E N S L A U F

Am 17. Januar 1935 wurde ich als Tochter des Zollsekretärs August B e h r und seiner Ehefrau Emilie in Branitz (Oberschlesien) geboren.

Nach 5 Klassen Volksschule besuchte ich die Oberrealschule in München-Pasing, an der ich im Juni 1954 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1954 begann ich mit dem tiermedizinischen Studium an der Universität München, das ich 1959 mit dem Staatsexamen abschloß.

